

**Deteksi *koi herpesvirus* (KHV) dengan metode
quantitative (real-time) - polymerase chain reaction
(qPCR) menggunakan *hydrolysis probe***



© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum.....	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	3
6 Prosedur	3
7 Interpretasi hasil	5
8 Jaminan mutu	8
Lampiran A (normatif) Ekstraksi	9
Bibliografi	10



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *koi herpesvirus* (KHV) dengan metode *quantitative (real-time) –polymerase chain reaction* (qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan akan dibahas dalam rapat konsensus pada tanggal 26 Agustus 2013 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 8 November 2013 sampai dengan 6 Januari 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *koi herpesvirus* (KHV) dengan metode *quantitative (real-time) - polymerase chain reaction* (qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *koi herpesvirus* (KHV) dengan metode *quantitative (real-time) - polymerase chain reaction* (qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan dan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan.

2.1

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro*

2.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.3

quantification cycle (Cq)/ cycle threshold (Ct)/ crossing point (Cp)

titik perpotongan antara kurva amplifikasi kontrol negatif dengan sampel atau titik awal terjadinya kenaikan kurva amplifikasi

2.4

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.5

deoxyribo nucleic acid (DNA)

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

2.6

ekstensi

proses pemanjangan sekuen DNA diawali dari primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal

2.7

hydrolysis probe

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang dilabel dengan sebuah *fluorophore* secara kovalen pada ujung 5' dan sebuah *quencher* pada ujung 3' yang akan berpendar ketika terjadi proses amplifikasi

2.8

kuantifikasi

pernyataan jumlah satuan dalam angka

2.9

kontrol negatif amplifikasi (*No Template Control/NTC*)

kendali hasil reaksi PCR dengan menggunakan *template* berupa *nuclease-free water* yang diperlakukan sama dengan hasil ekstraksi contoh uji untuk mengetahui terjadinya suatu kontaminasi dari dalam pada pelaksanaan qPCR

2.10

kontrol negatif ekstraksi (*Negative Extraction Control/NEC*)

kendali hasil reaksi PCR dengan menggunakan hasil ekstraksi yang berasal dari *nuclease-free water* untuk mengetahui terjadinya suatu kontaminasi pada proses ekstraksi

2.11

kontrol positif ekstraksi (*Positive Extraction Control/PEC*)

hasil ekstraksi yang berasal dari organ atau contoh uji yang terinfeksi

2.12

Limit of Detection (LOD)

jumlah *copy* atau molekul target terendah yang masih dapat dideteksi dengan tingkat kepercayaan 95 %

2.13

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.14

real-time PCR

suatu teknik PCR dengan metode analisa yang secara simultan dapat diamati hasil amplifikasinya

2.15

standar positif

plasmid yang mengandung DNA virus yang diketahui jumlah *copy*nya

2.16

template

urutan DNA tertentu yang akan diamplifikasi

3 Prinsip umum

Prinsip dari metode ini adalah mengisolasi dan memurnikan DNA dari organ target/jaringan yang diduga terinfeksi KHV untuk diamplifikasi secara *real-time*.

4 Peralatan

- alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis UV *Spectrophotometry*;
- centrifuge*;
- dissecting set*;
- heating block*;
- laminar air flow cabinet*;
- mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- minimixer*;
- 1 paket mesin *real-time PCR*;

- i) *rack ice block*;
- j) *spindown centrifuge*.

5 Bahan

- a) bufer TE 10 mM Tris HCl dan 1 mM EDTA pH 7.5;
- b) etanol absolut p.a;
- c) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl;
- d) kit ekstraksi DNA dengan metode *spin column*;
- e) kit *real-time* PCR komersial kompatibel dengan *TaqMan[®] probe*;
- f) kontrol positif KHV;
- g) larutan ekstraksi DNA komersial;
- h) larutan pembersih kontaminan DNA;
- i) masker;
- j) *nuclease-free water*;
- k) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- l) sarung tangan (*powder - free*);
- m) standar DNA plasmid KHV;
- n) 1 set primer spesifik dan *probe*:
 - KHV F: 5'- GAC GCC GGA GAC CTT GTG-3'
 - KHV R: 5'- CGG GTT CTT ATT TTT GTC CTT GTT-3'
 - KHV *probe*: 5'- FAM-CTT CCT CTG CTC GGC GAG CAC G-TAMRA -3'
- o) tabung mikro ukuran 1,5 ml – 2 ml;
- p) tabung atau *microplate* PCR optikal ukuran 0,1 ml - 0,2 ml atau tabung kapiler ukuran 20 µl - 100 µl.

CATATAN1 bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan

CATATAN2 bisa menggunakan primer dan *TaqMan[®] probe* lainnya yang sudah divalidasi dan diverifikasi di laboratorium.

6 Prosedur

6.1 Persiapan contoh uji

- a. ukuran < 2 cm
contoh uji berupa seluruh bagian tubuh.
- b. ukuran > 2 cm
organ target untuk ikan mas dan koi, berupa insang sedangkan untuk jenis ikan lainnya digunakan ginjal atau limpa.

6.2 Ekstraksi DNA

6.2.1 Metode presipitasi

- a) bersihkan alat dan tempat menggunakan larutan pembersih kontaminan DNA;
- b) masukkan 25 mg – 50 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml;
- c) tambahkan 1 000 µl larutan ekstraksi DNAzol (Kit komersial), homogenkan menggunakan *pellet pestle*;
- d) sentrifugasi pada 10 000 x g selama 10 menit;
- e) pindahkan supernatan 500 µl - 700 µl ke tabung mikro baru yang telah diisi 500 µl etanol absolut p.a.;

- f) kocok tabung mikro secara perlahan, diamkan selama 1 menit - 3 menit pada 25 °C – 30 °C;
- g) sentrifugasi pada 4 000 x g selama 1 menit kemudian buang supernatan;
- h) cuci pelet DNA dengan menambahkan 800 µl - 1 000 µl etanol 75 %;
- i) campur dengan cara membolak-balikkan tabung mikro sebanyak 6 kali dan diamkan beberapa saat hingga DNA terkumpul di dasar tabung mikro;
- j) sentrifugasi pada 7 000 x g selama 1 menit - 2 menit kemudian buang etanol;
- k) ulang sekali lagi langkah g, h, dan i;
- l) kering anginkan selama 5 detik - 15 detik;
- m) larutkan DNA dengan menambahkan 200 µl - 300 µl larutan NaOH dan HEPES (konsentrasi larutan terlampir);
- n) ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm (A_{260});
- o) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- p) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280});
- q) simpan larutan DNA pada 4 °C apabila segera digunakan atau -20 °C untuk penyimpanan lebih lama, pada pH 7-8.

CATATAN 1 Prosedur di atas merupakan contoh uji ekstraksi DNA yang menggunakan kit komersial DNAzol (In vitrogen)

CATATAN 2 Prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan

6.2.2 Metode *spin column*

- a) masukkan 30 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml kemudian tambahkan 200 µl bufer GT, gerus dengan *pellet pestle*;
- b) tambahkan 20 µl proteinase K ke dalam homogenat, homogenkan sebentar kemudian inkubasikan pada 60 °C selama 30 menit, bolak-balikan tabung setiap 5 menit;
- c) tambahkan 200 µl bufer GBT, homogenkan selama 5 detik;
- d) inkubasikan pada 60 °C selama 20 menit, bolak-balik tabung mikro setiap 5 menit;
- e) sentrifugasi selama 2 menit pada 14 000 g, kemudian pindahkan supernatan ke tabung 1,5 ml yang baru;
- f) tambahkan 4 µl RNase A (10 mg/ml) ke dalam larutan supernatan dan homogenkan sebentar kemudian inkubasi pada suhu 28 °C – 30 °C selama 5 menit;
- g) tambahkan 200 µl etanol absolut p.a ke dalam tabung mikro, homogenkan 10 detik;
- h) letakkan GD *column* ke dalam *collection tube* 2 ml;
- i) masukkan contoh uji ke dalam GD *column*, sentrifugasi 14 000 x g selama 2 menit;
- j) buang *collection tube*, masukkan GD *column* ke dalam *collection tube* yang baru;
- k) bilas dengan menambahkan 400 µl bufer W1 kedalam GD *column*, sentrifugasi 14 000 x g selama 30 detik;
- l) buang cairan dalam *collection tube*;
- m) bilas kembali dengan menambahkan 600 µl bufer W2 ke dalam GD *column*, sentrifugasi 14 000 x g selama 30 detik;
- n) buang cairan dalam *collection tube*, sentrifugasi 14 000 x g selama 3 menit;
- o) pindahkan GD *column* ke dalam tabung mikro 1,5 ml baru;
- p) masukkan 100 µl *elution buffer* yang telah dipanaskan pada 60 °C ke dalam *column* bagian tengah;
- q) biarkan selama 5 menit untuk meyakinkan *elution buffer* benar-benar terserap;
- r) sentrifugasi 14 000 x g selama 30 detik untuk melepaskan DNA dari *column*;
- s) ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm (A_{260});

- t) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- u) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280});
- v) simpan larutan DNA pada -20 °C.

CATATAN 1 Prosedur di atas merupakan contoh uji ekstraksi DNA yang menggunakan kit komersial Genomic DNA mini kit (Geneaid)

CATATAN 2 Prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan.

6.3 Amplifikasi

- a) cairkan template DNA, *primer*, *probe*, *PCR master mix*, *nuclease-free water*, dan letakkan di atas es;
- b) buat *cocktail* amplifikasi sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *cocktail* 10 % lebih banyak dari yang dibutuhkan;
- c) homogenkan semua bahan *cocktail* amplifikasi dan distribusikan 15 µl ke masing-masing tabung/*microplate*/kapiler PCR optikal;
- d) tambahkan 5 µl *template* DNA (10 ng – 100 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi, kontrol negatif ekstraksi; kontrol negatif amplifikasi dan 5 standar positif (10 *copies*; 10² *copies*; 10³ *copies*; 10⁴ *copies*; 10⁵ *copies*);
- e) lakukan amplifikasi dengan *real-time* PCR sesuai Tabel 2.

Tabel 1 – Komposisi cocktail *real time* PCR

No	Nama Bahan	Volume per reaksi (µl)	Konsentrasi Akhir
1	<i>Fast universal PCR Master Mix</i> 2 x	10	1 x
2	Primer KHV <i>Forward</i> (10 µM)	1	0,5 µM
3	Primer KHV <i>Reverse</i> (10 µM)	1	0,5 µM
4	KHV <i>probe</i> (5 µM)	1	0,25 µM
5	<i>Nuclease free water</i>	2	
Total		15	
CATATAN Komposisi <i>cocktail</i> disesuaikan dengan manual kit yang digunakan			

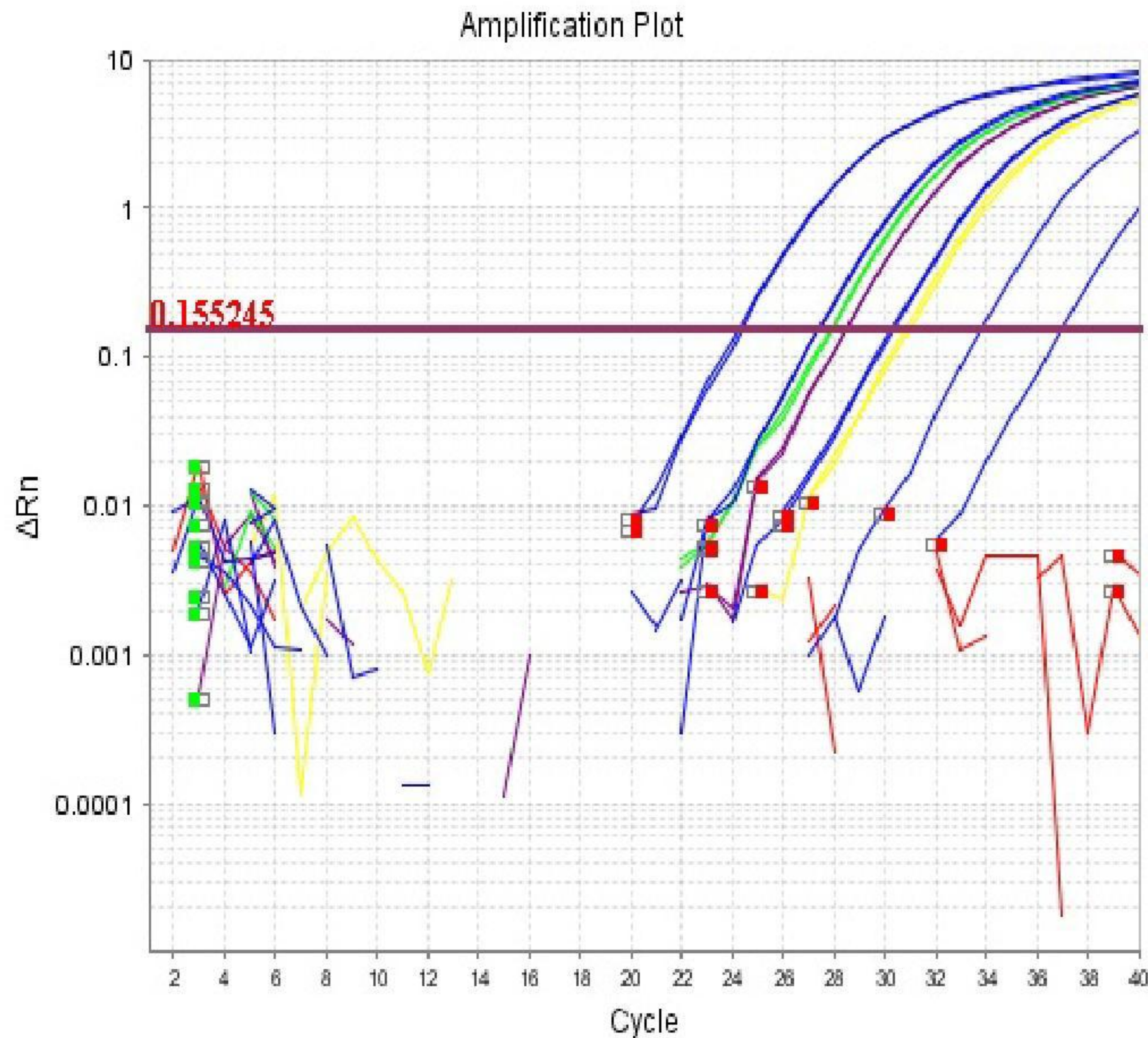
Tabel 2 – Program amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu (detik)	Siklus	Mode analisis
<i>Holding stage</i>	95	20		
<i>Cycling stage</i>	95	3	40	Kuantifikasi
	60	30		
CATATAN program amplifikasi disesuaikan dengan <i>manual kit</i> dan mesin <i>real-time</i> PCR yang digunakan				

7 Interpretasi hasil

Lakukan analisis data sesuai dengan *software real-time cycler* yang digunakan.

- a) Pengamatan selama proses *real-time* PCR:



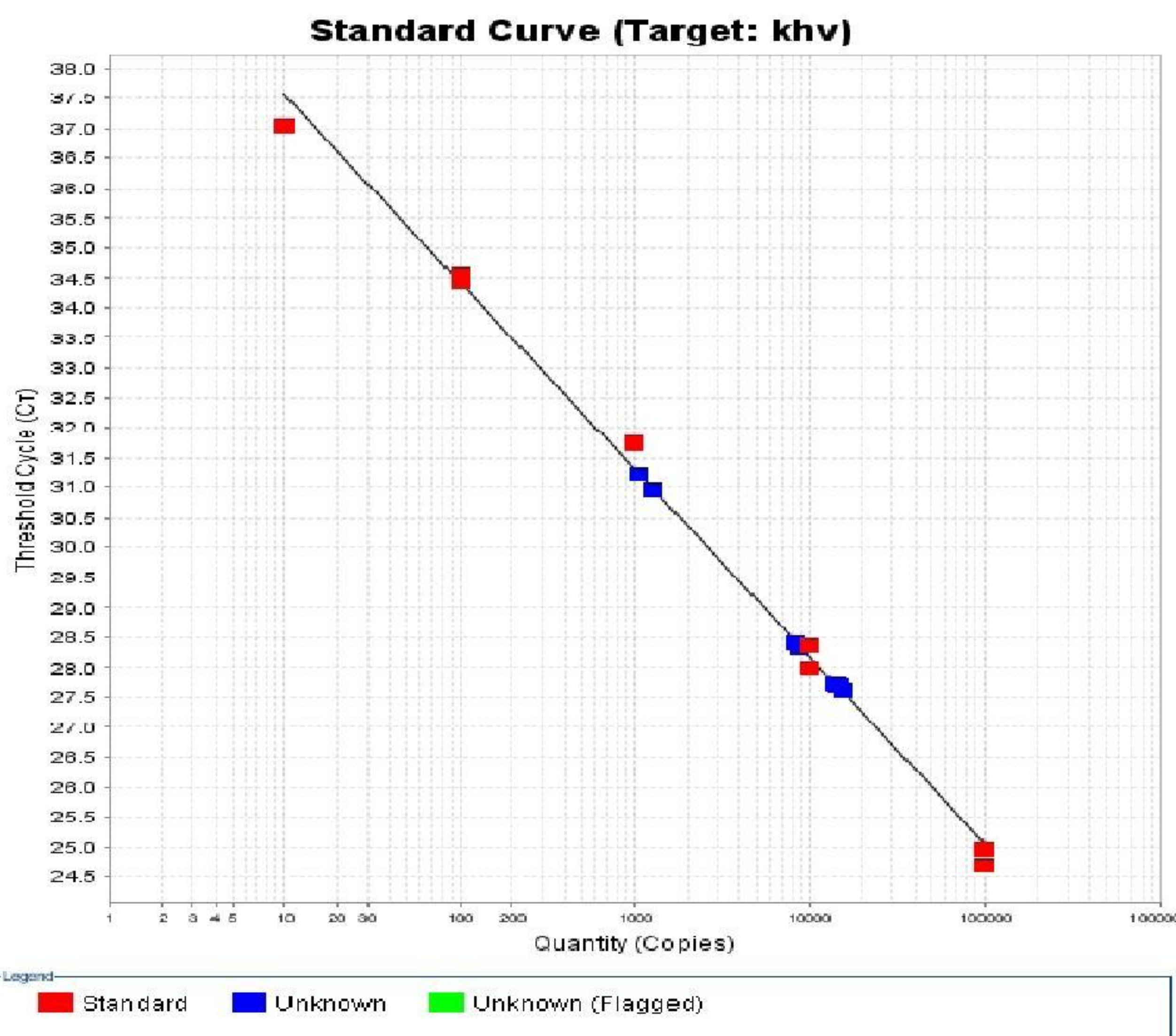
Gambar 1 – Contoh kurva amplifikasi

Interpretasi kurva *amplifikasi* adalah sebagai berikut:

- *threshold/cut off* ditentukan dengan menarik garis datar yang berada di atas perpotongan antara kontrol negatif amplifikasi dan kontrol negatif ekstraksi dengan kontrol positif ekstraksi dan standar positif.
- contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/cut off* dan nilai Cq lebih kecil atau sama dengan LOD.
- semakin cepat munculnya kurva dan memotong garis *threshold/cut off* menunjukkan jumlah *copy* DNA virus yang semakin banyak.
- contoh uji dinyatakan negatif apabila berada dibawah garis *threshold/cut off* dan nilai Cq lebih besar dari LOD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95 %.

b) Kuantifikasi *copy* virus

- jumlah *copy* virus dapat dilihat pada tabel laporan kuantifikasi di perangkat lunak komputer yang terhubung dengan mesin *real-time* PCR yang digunakan. Nilai positif akan terlihat dari nilai konsentrasi pada angka tertentu (tabel 3).



Gambar 2 – Contoh kurva standar dan contoh uji

Tabel 3 – Contoh laporan hasil kuantifikasi copy virus

Well	contoh uji	Target	Task	Kuantitas	Quantification cyle(Cq)
A1	1	KHV	Standar	10	37,03
A2	1	KHV	Standar	10	37,05
A4	2	KHV	Standar	100	34,58
A5	2	KHV	Standar	100	34,42
A8	3	KHV	Standar	1000	31,73
A9	3	KHV	Standar	1000	31,76
A10	4	KHV	Standar	10000	28,35
A11	4	KHV	Standar	10000	27,99
A12	5	KHV	Standar	100000	24,71
B1	5	KHV	Standar	100000	24,97
B2	A	KHV	Kontrol positif ekstraksi	14105	27,72
B3	A	KHV	Kontrol positif ekstraksi	14594	27,67
B4	6	KHV	Contoh uji A	8916	28,34
B5	6	KHV	Contoh uji A	8388	28,43

Tabel 3 – lanjutan

Well	contoh uji	Target	Task	Kuantitas	Quantification cycle(Cq)
B6	8	KHV	Contoh uji B	1061	31,23
B7	8	KHV	Contoh uji B	1291	30,96
B8	NEC	KHV	Negatif Ekstraksi		Undetermined*
B9	NEC	KHV	Negatif Ekstraksi		Undetermined
B10	NTC	KHV	Kontrol Negatif amplifikasi		Undetermined
B11	NTC	KHV	Kontrol Negatif amplifikasi		Undetermined

*Undetermined : tidak terdeteksi

8 Jaminan mutu

- proses ekstraksi DNA dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif ekstraksi dan kontrol negatif ekstraksi atau dengan menggunakan *reference gene* menunjukkan hasil yang konsisten;
- hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ berkisar 1,8 – 2,0;
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan 5 standar positif amplifikasi yang sudah terkuantifikasi dan kontrol negatif amplifikasi serta menunjukkan hasil yang konsisten;
- efisiensi amplifikasi dinyatakan baik apabila mempunyai nilai *slope* -3,10 sampai dengan -3,58;
- proses *real-time* PCR valid bila dilihat dari kurva standar dengan nilai koefisien determinasi (R^2) > 0,985;
- Keterulangan (*repeatability*) untuk pengujian duplo harus mempunyai nilai standar deviasi (SD) Cq lebih kecil dari 0,5;
- apabila hasil Cq dari contoh uji mendekati nilai LOD, maka harus dilakukan pengujian amplifikasi kembali sebanyak tiga kali ulangan terhadap contoh uji yang sama. Hasil uji yang dominan akan dipakai untuk menentukan hasil positif atau negatif.

Lampiran A
(normatif)
Ekstraksi

Ekstraksi menggunakan DNAzol direkomendasikan menggunakan pelarut DNA 8 mM NaOH dan 0,1 M atau 1 M HEPES dengan penggunaan setiap 1 ml 8 mM NaOH :

Tabel A.1 - Penambahan HEPES setiap 1 ml 8 mM NaOH

pH Akhir	HEPES 0,1 M	HEPES 1 M
8,4	86 µl	-
8,2	93 µl	-
8,0	101 µl	-
7,8	117 µl	-
7,5	159 µl	-
7,2	-	23 µl
7,0	-	32 µl

Bibliografi

Applied Biosystems. 2011. Taqman® Fast Universal PCR Master Mix (2x). Non Amp®Erase UNG. User guide.

Geneaid. 2013. Genomic DNA mini Kit (Tissue) Protocol.

Gilad O., Yun S., Zagmutt-Vergara F.J., Leutenegger C.M., Bercovier H. & Hedrick R.P. 2004. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 179–187.

Invitrogen. 2011. *Manual Protocol DNAzol® Reagent Extraction Kit*.

OIE, 2012. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal Office des International des Epizooties (OIE) Chapter 2.3.6

